

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS  
DE FÓSFORO APARTIR DE CUATRO SUELOS DE LA PROVINCIA DE  
CHIMBORAZO**

**ESTEBAN ANDRES GUZMAN ESTRADA.**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD RECURSOS NATURALES**

**ESCUELA INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2011**

### **DEDICATORIA**

La presente investigación la dedico a todas las personas que han contribuido con mi formación tanto a nivel personal como académico.

La dedico a las personas autodidactas que se esfuerzan por conseguir y formar el conocimiento de una manera espontanea.

## **AGRADECIMIENTO**

Un sincero agradecimiento a toda mi familia que ha contribuido de una manera activa para alcanzar mis expectativas en la vida.

Agradezco al departamento de Ciencias Biológicas en especial al Doctor Carlos Rodríguez por abrirme las puertas para realizar la investigación así como de brindarme sus conocimientos y experiencia en el campo de la microbiología.

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE GRÁFICOS.....	xii
LISTA DE ANEXOS.....	xiii

Número	CAPITULO	Pág.
I.	TÍTULO	1
II.	INTRODUCCIÓN	1
III.	REVISIÓN DE LITERATURA	5
IV	MATERIALES Y MÉTODOS	17
V.	RESULTADOS	26
VI.	DISCUSIÓN	37
VII.	CONCLUSIONES	39
VIII.	RECOMENDACIONES	40
IX	BIBLIOGRAFÍA	43
X	ANEXOS	45

## LISTA DE CUADROS

<b>Número</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
Tabla 1	Intervalos de suficiencia de la concentración de nutrientes en tejidos vegetales.	14
Tabla 2	Esquema del análisis de varianza del ensayo preliminar.	19
Tabla 3	Características generales de las muestras de suelo.	20
Tabla 4	Esquema del análisis de varianza para el experimento principal.	22
Tabla 5	Esquema del análisis de varianza para la eficacia de solubilización de fósforo insoluble.	25
Tabla 6	Número de ufc/g de posibles bacterias solubilizadoras de fósforo del experimento preliminar.	26
Tabla 7	Análisis de varianza para el número de ufc/g de suelo en el ensayo preliminar.	27
Tabla 8	Parámetros físicos químicos de las muestras de suelos.	27
Tabla 9	Número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo y suelo seco (ufc/g).	28
Tabla 10	Análisis de varianza para el número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de suelo seco (ufc/g) expresados en log base 10.	29
Tabla 11	Porcentajes de bacterias solubilizadoras de fósforo en los platos de aislamiento.	30
Tabla 12	Porcentajes de bacterias solubilizadoras de fósforo en los platos	30

de aislamiento.

Tabla 13	Análisis de varianza para el porcentaje de solubilizadores, en el aislamiento selectivo.	31
Tabla 14	Análisis de varianza para el índice de solubilización de bacterias aisladas del suelo.	33
Tabla 15	Separación de medias para el número de UFC/g de suelo del aislamiento selectivo.	34

**LISTA DE GRÁFICOS**

<b>Número</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pag.</b>
Gráfico 1	Número de ufc/g de suelo seco por sitio de recolección	29
Gráfico 2	Número de aislamientos por sitio de recolección	32
Gráfico 3	Número y porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo por sitio de recolección.	33
Gráfico 4	Número de bacterias según la forma de la célula y reacción de Gram.	36

**LISTA DE ANEXOS**

<b>Número</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
Anexo 1	Medios de cultivos	46
Anexo 2	Procedimiento para la tinción de gram.	48
Anexo 3	Datos experimentales.	50
Anexo 4	Códigos de almacenamiento y resultados de solubilización de las bacterias.	52
Anexo 5	Caracterización microscópica.	59



# **I. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO APARTIR DE CUATRO SUELOS DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO.**

## **II. INTRODUCCION.**

El fósforo es un macroelemento esencial para las plantas porque forma parte de compuestos orgánicos esenciales, como aquellos que le transportan energía en las células (ATP), hasta los nucleótidos, que son componentes importantes de los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Una deficiencia de fósforo en un cultivo puede provocar un crecimiento lento, poco desarrollo del sistema radicular, y una coloración atípica en las hojas, por lo que influye directamente en la producción normal de la planta.

El fósforo en el suelo se presenta en diversas formas. La forma inorgánica puede estar en forma soluble ( $\text{H}_2\text{PO}_4$ ), o como formas insolubles asociadas a minerales y adsorbidos en las superficies de óxidos de hierro y aluminio hidratados. El fósforo orgánico forma parte de diversos compuestos, principalmente fosfatos de inositol y ácidos nucleicos.

Gran porcentaje de los suelos de la provincia de Chimborazo son usados para la explotación agrícola, tanto en la zona andina como en la zona subtropical. Estos suelos presentan un bajo contenido de fósforo y alto grado de formación de compuestos insolubles, principalmente fosfatos tricálcicos y fosfatos de hierro. La adición de fertilizantes fosfatados tiene una baja eficiencia debido a la rápida insolubilización de los mismos.

Una forma de movilizar el fósforo insoluble del suelo es a través de la participación de microorganismos que tienen la capacidad de solubilizar el fósforo. Algunos producen ácidos orgánicos, lo que permite solubilizar el fosfato insoluble. Otro mecanismo usado por los microbios involucra la producción de fosfatasas, las que mediante procesos enzimáticos transforman el fósforo en moléculas asimilables para las plantas.

## **A. JUSTIFICACION.**

La utilización de fertilizantes químicos de fuente mineral, con poca eficiencia en el suelo, provoca un incremento en los costos de producción debido a su alto precio y a las altas dosis que se deben usar para contrarrestar la cantidad de fertilizante que no llega a estar disponible para las plantas. Además las repercusiones en el medio ambiente se incrementan, por la acumulación de compuestos insolubles y sales, que pueden afectar gravemente los suelos, y por ende el desarrollo de la agricultura.

El desarrollo de la biotecnología microbiana ha permitido que varios grupos de microorganismos comiencen a ser usados como alternativas válidas en el proceso de producción agrícola. Un ejemplo de ello es el uso de microorganismos capaces de solubilizar fósforo en el suelo, los que podrían ser usados para movilizar fósforo insoluble y de esa manera hacerlo disponible al sistema radicular de las plantas. Estos microbios podrían convertirse en una alternativa válida para la agricultura, al disminuir el uso de fertilizantes fosfatados y estimular la producción más limpia de vegetales.

El presente estudio pretende aislar, caracterizar e identificar microorganismos del suelo que tengan la capacidad de solubilizar fósforo mediante la producción de ácidos orgánicos. La posibilidad de encontrar alternativas validas más limpias en la producción agrícola, justifica ampliamente la ejecución de estudios como el que se pretende realizar. No solamente se obtendrán productos de mejor calidad, sino que también se estará cuidando el medio ambiente, al disminuir el uso indiscriminado de fertilizantes.

## **B. OBJETIVOS.**

### **1. Objetivo general.**

Aislar y caracterizar bacterias solubilizadoras de fósforo de cuatro suelos de la provincia de Chimborazo.

### **2. Objetivos específicos.**

**a.** Seleccionar un medio de cultivo adecuado para el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fósforo.

**b.** Determinar la población y porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo presentes en cuatro suelos de la provincia de Chimborazo.

**c.** Establecer la eficiencia de solubilización de fósforo insoluble en condiciones *in vitro*.

**d.** Caracterizar microscópicamente las bacterias eficientes en la solubilización del fósforo

**C. HIPOTESIS.**

**1. Hipótesis nula.**

Ninguna de las bacterias aisladas en cultivo puro es capaz de solubilizar fósforo insoluble.

**2. Hipótesis alternante.**

Al menos una de las bacterias aisladas es capaz de solubilizar fósforo insoluble.

### **III. REVISION DE LITERATURA.**

#### **A. GENERALIDADES.**

Los microorganismos y los productos del metabolismo celular intervienen en forma muy activa en la formación y estabilización de la estructura del suelo, lo que tiene un efecto directo sobre el desarrollo de las plantas. La función más importante que realiza la población microbiana del suelo es la transformación de la materia orgánica, animal o vegetal, como resultado de la actividad de las bacterias, hongos, y otros microorganismos (Garassini, 1967). La diversidad de microorganismos que se encuentran en el suelo es muy importante, ya que de ellos depende la transformación de los componentes orgánicos e inorgánicos (Higuera, 2001). Ciertos microbios que se desarrollan cerca de las raíces de las plantas, en los que están incluidos algunos grupos de bacterias, hongos y actinomicetes, elaboran elementos nutritivos, especialmente nitrógeno y fósforo, que son utilizados por las mismas raíces para nutrir la planta (Garassini, 1967).

#### **B. EL FÓSFORO EN EL SUELO.**

La cantidad total de fósforo en el suelo puede ser alta, sin embargo este puede estar presente en forma indisponible o en formas que estén solo disponibles fuera de la rizósfera. En algunos suelos, más del 80% del fósforo aplicado al suelo se vuelve inmóvil, y por lo tanto no asimilable para la absorción por parte de las plantas. Entre el 20 al 80% del fósforo del suelo está en forma orgánica, el remanente se puede encontrar en la fracción inorgánica, contenido en cerca de 170 formas minerales de fósforo (Schachiman 1997).

El fósforo se halla en el suelo como fluorapatita finamente dividida, hidroxiapatita, o clorapatita, o en combinación con partículas de suelo. También se halla en combinación con el humus y otras fracciones orgánicas (Tisdale, 1988). El fósforo aparece en el suelo bajo la forma de ortofosfatos en ciertos minerales, como los fosfatos de calcio insolubles, así como adsorbidos en las superficies de los óxidos de hierro y aluminio hidratados. Las plantas absorben el fósforo casi exclusivamente en forma de ión  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Moorby, 1982).

El suministro a las plantas depende del equilibrio y tasa de liberación de los iones  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , de los compuestos de calcio, hierro y aluminio, a los cuales se encuentra ligado, y de la materia orgánica en descomposición. Cuando se agrega al suelo una forma soluble como el fosfato monocalcico ( $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ), rápidamente se convierte en la forma di cálcica  $\text{CaHPO}_4$ , que queda absorbida en los minerales arcillosos. Esto lleva a que se mantenga una concentración de iones  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  en la solución del suelo de 0.003 a 3 mg/Kg, dependiendo del tipo de suelo (Moorby, 1982).

### 1. **Fósforo activo.**

El fósforo activo es el que se encuentra en la fase sólida, y es fácilmente descargado a la solución del suelo, en donde es absorbido por las plantas. Conforme la concentración de fosfatos en la solución decrece, parte del fósforo activo es descargado a la solución. Debido a que la cantidad de fósforo es muy pequeña, el fósforo activo es la principal fuente de fósforo disponible para las cosechas (Busman, 2002).

De la facilidad con que el fósforo activo pueda ser liberado a la solución del suelo depende de que un suelo sea fértil o no con respecto al fósforo. El fósforo activo puede contener una cantidad de fósforo inorgánico, el que esta adsorbido en sitios activos de la superficie de las partículas de suelo. Este fósforo reacciona con elementos como el calcio, y aluminio, para formar algunos sólidos solubles. Por otro lado, también puede contener fósforo orgánico que es fácilmente mineralizado. (Busman, 2002).

## 2. Fósforo fijado en las arcillas y los óxidos de hierro y aluminio.

El fósforo fijado puede contener compuestos fosfatados inorgánicos que son muy insolubles y compuestos orgánicos que sean resistentes a la mineralización por microorganismos presentes en el suelo. Esta fuente de fósforo puede permanecer en el suelo por muchos años sin estar disponible para las plantas y no aporta a la fertilidad del suelo (Busman, 2002).

Los compuestos fosfatados inorgánicos que forman parte del fósforo fijado, se presentan en forma de cristales, y son menos solubles que aquellos compuestos que forman parte de reservorio de fósforo activo (Busman, 2002). Los iones fosfato pueden fijarse al complejo arcilloso húmico, y en particular sobre las arcillas, por medio de un puente de calcio. El suelo deja en reserva una parte del  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  de los abonos y lo devuelve después a la solución del suelo a medida que la planta va agotando esta solución por la adsorción de una parte de dichos iones. Los iones  $\text{PO}_4^{=}$  fijados en la arcilla cálcica son fácilmente recuperables. La cantidad de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  adsorbido depende del contenido de arcilla, de su capacidad de cambio y del pH, es decir, de la cantidad de iones  $\text{Ca}^{++}$  presentes (Guerrero, 2006). Existen también en el suelo hidróxidos de hierro y aluminio, especialmente en los suelos ácidos, que se comportan como coloides electropositivos, pudiendo fijar iones  $\text{PO}_4^{=}$ . Este tipo de fosfatos pasan después a la solución del suelo, pero más lentamente que los que se fijan sobre la arcilla. Por eso se dice que son menos cambiables. Aunque el  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  absorbido no supone más que una parte pequeña del  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  total, constituye la mayor parte del  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  asimilable o cambiante. Dependiendo del suelo este puede alcanzar de 500 a 3.000 kg/Ha (Guerrero, 2006).

### 3. **Fósforo en la solución del suelo.**

La cantidad de fósforo en la solución del suelo es muy pequeña, pudiendo encontrar una fracción de una libra por acre (1,118 Kg /Ha). El fósforo de la solución puede presentarse usualmente en forma de ortofosfato, y constituye el reservorio más importante para las plantas (Busman, 2002). La concentración de las soluciones en forma de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  es muy pequeña, de 0,2 a 0,5 mg/litro, es decir, que para un terreno con 30 cm de profundidad, supondría de 200 a 500 gramos de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  por hectárea. En los suelos ricos se puede alcanzar y sobrepasar un miligramo por litro, mientras que en los suelos pobres la riqueza puede bajar hasta 0,1 mg/litro (Moorby, 1982).

### 4. **Factores que afectan la solubilidad de fósforo en el suelo.**

Existen varios factores que influyen en la solubilidad del suelo. Por ejemplo, suelos con una alta cantidad de arcilla fijan más fósforo que aquellos que contienen menos arcilla. Los suelos con contenidos altos de ciertas arcillas como la caolinita, óxidos e hidróxidos de Fe y Al (comunes en las regiones del mundo con alta precipitación y temperatura), y arcillas amorfas como alófana, imogolita y complejos humus-Al (comunes en suelos formados de ceniza volcánica), retienen o fijan más fósforo que otros suelos. Sin embargo, sin importar el tipo de arcilla presente, el fósforo aplicado al suelo pasa rápidamente a formas menos disponibles (Gros, 1986).

La época de aplicación también constituye otro factor. Cuando mayor sea el tiempo que el suelo, mayor es la posibilidad de fijación. En suelos de alta fijación, el cultivo debe usar el fósforo antes que la fijación saque el fósforo de la solución del suelo. En otros tipos de suelo, el fósforo puede estar disponible por años. Este período crítico durante el cual la planta puede utilizar efectivamente el fósforo aplicado determina la época de fertilización (Gros, 1986).



Por otro lado, el oxígeno ( $O_2$ ) es necesario para el crecimiento de las plantas y para la absorción de nutrientes. También es esencial para la descomposición microbológica de la materia orgánica del suelo. En un suelo bien aireado, la liberación del fósforo como producto de la descomposición, será mayor que en un suelo poco aireado (Gros, 1986). La compactación reduce la aireación y el espacio poroso en la zona radicular. Esto reduce la absorción de fósforo y el crecimiento de la planta. La compactación también reduce el espacio del suelo en el cual penetran las raíces de la planta, limitando de esta forma su acceso completo al fósforo del suelo. El hecho de que el fósforo se mueve a distancias muy cortas en la mayoría de los suelos incrementa los problemas ocasionados por un crecimiento radicular restringido y la limitada absorción debido a la compactación (Gros, 1986). El incrementar la humedad del suelo a niveles óptimos hace que el fósforo este más disponible para las plantas. Sin embargo, el exceso de humedad reduce el  $O_2$ , lo que limita el crecimiento de las raíces y hace lenta la absorción de fósforo (Gros, 1986).

Los suelos que han recibido por varios años más fósforo que la cantidad removida en los cultivos presentarán un incremento en los niveles de disponibilidad de fósforo lo suficiente para reducir su aplicación. Es importante el mantener altos niveles de fósforo en el suelo para mantener una producción óptima de los cultivos (Gros, 1986).

Las temperaturas ideales para un buen crecimiento de la planta afectan muy poco la disponibilidad de fósforo. Las altas temperaturas estimulan la descomposición de la materia orgánica. Sin embargo, las temperaturas muy altas o muy bajas pueden restringir la absorción. Por esta razón las plantas responden a las aplicaciones de arranque en suelos fríos y húmedos, aun cuando los niveles de P en el suelo sean altos (Gros, 1986).

La aplicación de otros nutrientes puede estimular la absorción de fósforo. El calcio en suelos ácidos y el azufre en suelos alcalinos parecen incrementar la disponibilidad de fósforo igual que lo hace el amonio ( $NH_4^+$ ). Sin embargo, la fertilización con zinc, en un cultivo que está al borde de una deficiencia de P, parece restringir aun más la absorción de P (Gros, 1986).

Existe una dependencia muy estrecha entre el pH del suelo y la presencia de formas asimilables y formas bloqueadas de fósforo para la nutrición vegetal. En los suelos de pH ácido, el fósforo asimilable suele presentarse en forma de fosfatos de hierro y aluminio. En los suelos de pH neutro, en cambio, existen fosfatos de calcio soluble, pero con un pH superior a 7.5 aumentan las formas insolubles del fósforo, no son asimilables por las plantas (Cuerda, 2000).

### **C. FORMAS DE SOLUBILIZACION DEL FÓSFORO EN EL SUELO.**

#### **1. Producción de ácidos orgánicos**

Los ácidos orgánicos actúan sobre compuestos insolubles de fosfato inorgánico como el fosfato tricálcico, fosfato dicálcico, hidroxiapatita y roca fosfórica. Ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el oxálico, cítrico, láctico, y succínico, se producen en el suelo como resultado de la descomposición de la materia orgánica. La cantidad y tipo de ácidos orgánicos depende de los diferentes grupos de microorganismos. Los ácidos orgánicos permiten que haya solubilización debido a que su presencia cambia los valores de pH hasta valores ácidos, en donde el número elevado de protones provoca, por competencia en los sitios de adsorción del fósforo, el cambio de las cargas superficiales de los adsorbentes, dando como resultado la solubilización (Catalina, 2008). Los ácidos orgánicos forman complejos solubles con iones de metales como el calcio (quelatos), aluminio y hierro que están asociados a fósforo insoluble, haciendo que el fósforo quede en forma disponible, reduciendo la adsorción (Rincón, 2008).

## 2. **Oxidación y reducción del fósforo.**

Los estados de oxidación del fósforo van desde el -3 (fosfina) hasta el +5 (ortofosfato). Los microorganismos pueden realizar éstas transformaciones cuando al utilizar el fosfito lo transforma en fosfatos en el interior de la célula. Este proceso puede ser reprimido por inhibidores biológicos tales como tolueno. A través de este proceso se provoca la solubilización del fósforo al reaccionar con los iones del suelo (Hyland *et al*, 2005).

## 3. **Mineralización.**

Los microbios pueden convertir el fósforo orgánico a  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  o  $\text{HPO}_4^{=}$ , que son formas disponibles para las plantas. El fósforo orgánico puede ser mineralizado como subproducto de la descomposición de la materia orgánica, o mediante la acción de enzimas específicas que son reguladas por la demanda de este nutriente (Picone y Zamuner, 2002).

## 4. **Producción de fosfatasas.**

En la rizosfera, la presencia de un gran depósito de fósforo orgánico, el cual no puede ser utilizado por las plantas, enfatiza el papel de la flora microbiana en la producción de diferentes enzimas pertenecientes al grupo de las fosfatasas. Estas están involucradas en la mineralización del fósforo, y al parecer están reguladas por la expresión de varios genes (Catalina, 2008). Las fosfatasas pueden ser sintetizadas, tanto por las raíces de las plantas (producen fosfatasas ácidas), como por ciertos grupos de bacterias y hongos capaces de producir fosfatasas ácidas y alcalinas (Ridge *et al*, 1974).

Aunque gran parte de la actividad mineralizadora del fósforo orgánico ha sido atribuida a las micorrizas, es posible encontrar microorganismos asociados al proceso de descomposición de materia orgánica, que también realizan este proceso mediante la producción de fosfatasas. El potencial de las enzimas producidas por estos organismos en la mineralización de compuestos orgánicos de fósforo es de gran importancia ecológica (Rincón, 2008).

Existen tres tipos de fosfatasas: ácida, alcalina y las fosfatasas con alta especificidad por el sustrato. Muchas de éstas han sido identificadas en una gran variedad de hongos. Dada la importancia de esta característica de la flora micótica, su presencia en la zona de la rizosfera resulta de gran valor para el crecimiento de las plantas (Catalina, 2008).

#### **D. FISILOGIA DEL FÓSFORO EN LA PLANTA.**

El fósforo es un componente esencial de las plantas, alcanzando concentraciones (en forma de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) entre el 0,5 al 1% de la materia seca. Se encuentra, en estado mineral, y en forma de compuestos orgánicos fosforados como fosfolípidos, fitina, nucleótidos y ácidos nucleicos (Milthope, 1982).

El papel fundamental del fósforo en la transferencia de energía ha sido bien comprobado, tanto en la formación de ATP durante la respiración celular, y fotosíntesis, como en la formación del  $\text{NADPH}+\text{H}^+$ , necesarios para la síntesis de nueva materia orgánica. Como el nitrógeno, el fósforo es un factor de crecimiento muy importante, existiendo una fuerte interacción entre éstos dos elementos, sobretudo durante las fases iniciales de crecimiento (Milthope, 1982).

El desarrollo radicular se ve favorecido por una buena provisión de fósforo a la siembra, por lo que es necesario añadir una pequeña cantidad de  $P_2O_5$ , especialmente en suelos pobres. En términos generales, puede decirse que es un elemento regulador de la vegetación y, por tanto, un factor de calidad. Favorece precisamente los periodos de vegetación que son críticos para el rendimiento del cultivo como germinación, fecundación, maduración y movimiento de las reservas (Milthope, 1982).

El fósforo es absorbido por las raíces y transportado por el xilema a las hojas jóvenes. La concentración del fósforo inorgánico en el xilema es de un milimol. En plantas que presentan deficiencia, la concentración es de 7 milimoles, mientras que en plantas con un crecimiento normal, la concentración es de 125 micromoles de fósforo inorgánico. El fósforo también puede ser translocado por el floema, desde las hojas, hacia los sitios de crecimiento rápido y las raíces. En plantas con déficit de fósforo inorgánico, el suministro de fósforo a las zonas de crecimiento es realizado mediante la movilización del fósforo guardado en las hojas viejas, y translocado hacia las hojas jóvenes y raíces en crecimiento. Este proceso involucra tanto el consumo del fósforo almacenado, y el desdoblamiento del fósforo orgánico a inorgánico (Schachiman, 1997).

Una provisión insuficiente de fósforo se manifiesta en análisis de partes de la planta como son las hojas y semillas, los que generalmente muestran contenidos bajos en relación a la concentración ideal (suficiencia) del elemento en los tejidos vegetales (Tabla 1). Las carencias de  $P_2O_5$  se ponen de manifiesto por un follaje de color verde oscuro, casi azulado, y por las tonalidades amarillentas y púrpuras, y el secado de la punta de las hojas. Las deficiencias de fósforo para las plantas traen consecuencias negativas, ya que el cultivo presenta retrasos en el crecimiento, fecundaciones defectuosas, movimientos anormales de las reservas y retrasos en la maduración. Todo esto provoca reducciones en las cosechas con una disminución notoria de la calidad (Milthope. M, 1982).

**Tabla 1. Intervalos de suficiencia de la concentración de nutrientes en tejidos vegetales.**

Especie (órgano)	Contenido (% en peso seco.		
	N	P	K
Trigo (toda la parte aérea)	3-4.5	0,3-0,5	2.9-3.8
Maíz (hoja madura)	2.7-3.5	0,4-0.7	2.5-3.5
Remolacha (hoja madura)	4-6	0.35-0,6	3.5-6
Tomate (hoja madura)	4-5.5	0.4-0.65	3.0-6.0
Algodón (hoja madura)	3.6-7	0.3-0.5	1.7-3.5
Alfalfa (hoja madura)	3.5-5	0.3-0.6	2.5-3.8
Manzana (hoja madura)	2.2-2.8	0,18-0,30	1.1-1.5
Naranja (hoja madura)	2.4-3.5	0.15-0,30	1.2-2.0

FUENTE: (Azcón V, 2003)

## **E. MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO EN EL SUELO.**

### 1. **Bacterias solubilizadores de fósforo.**

Se establece dos tipos de bacterias que solubilizan el fósforo. Unas lo hacen a partir de formas orgánicas y las otras de formas inorgánicas. *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus* y *Pseudomonas putida* solubilizan las formas orgánicas del fósforo y las transforman a fosfatos asimilables por las plantas (Higuera, 2002). Formas inorgánicas son solubilizadas por bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Rhizobium*, y *Serratia* (Niklitschek, 2000).

### 2. **Hongos solubilizadores de fósforo.**

Entre los hongos solubilizadores de ortofosfato se encuentran *Penicillium implicatum*, *Penicillium vitéo-viridae*, *Paecilomyces*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Scopulariopsis*, *Moniliella*, y *Mortierella* (Yerly, 2004). Por otro lado, fosfatos tricálcicos son transformados por *Trichoderma aureoviride*, y *Aspergillus aculeatus*. Finalmente, el fosfato de hierro es solubilizado por *Aspergillus oryzae*, *Paecilomyces*, *Gongronella butleri*, y *Fusarium oxysporum*. (Vera, 2002).

### 3. **Actinomicetes y levaduras como solubilizadores de fósforo.**

Levaduras del género *Saccharomyces* y *Rhodotorula* son capaces de transformar fósforo orgánico (Higuera, 2002). Dentro de los actinomicetes, representantes del género *Streptomyces* han demostrado la producción de fosfatasas, principalmente durante los procesos de descomposición de materia orgánica.

## **F. METODOS PARA DETERMINAR LA SOLUBILIZACIÓN DE FÓSFORO IN VITRO.**

### **1. Halo de solubilización.**

Consiste en extraer de un cultivo puro, una parte de una colonia, para posteriormente colocar el inóculo en cajas petri que contengan el medio propuesto (Sundara, 1963) solubilización se determina estableciendo la presencia de un halo alrededor de la colonia, luego de un período de incubación de 14 días a 28°C. Para medir el Índice de solubilización (I.S.) se procede a realizar la lectura del diámetro de la colonia y luego del diámetro del halo formado por el microorganismo para establecer mediante una fórmula la eficacia relativa de solubilización por parte de los microorganismos estudiados (Premono et al, 1996).

$$\text{Eficiencia de solubilización} = \frac{Dc + Dh}{Dc}$$

Donde:

Dc = Diámetro de la colonia (mm)

Dh = Diámetro del halo de solubilización (mm)

### **2. Método de cuantificación de actividad enzimática.**

El método cuantifica la producción de fosfatasas producida por los microorganismos fosfato solubilizadores. Para esto, se emplea el método de p-nitrofenilfosfato, en donde el compuesto fosfatado es transformado a orto fosfato. La concentración del producto de la hidrólisis es proporcional a la actividad de la fosfatasa (Dik *et al*, 2000; Otalora, 2003).





#### **IV. MATERIALES Y METODOS**

##### **A. ENSAYO PRELIMINAR.**

Un ensayo preliminar se realizó para determinar la metodología a seguir en el aislamiento selectivo de solubilizadores de fósforo a partir de muestras de suelo. Para ello se usó una muestra de la colección de suelos del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales. El suelo fue recolectado de la rizósfera de una plantación de babaco. Se utilizó un medio de cultivo con glucosa y sales minerales, suplementado con una fuente insoluble de fósforo (fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ); Anexo 1). El pH del medio de cultivo fue ajustado a 7, para finalmente proceder a esterilizar a  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Previo al vertido del medio estéril en cajas petri, se añadió nistatin a una concentración final de 75 ug/ml, para evitar el crecimiento de hongos. El medio fue vertido en cajas petri estériles, y a la mitad de ellos se añadió púrpura de bromocresol (15 ml/litro de una solución stock al 0.04% w/v) y la otra mitad sin la adición de éste compuesto. La adición del púrpura de bromocresol se realizó para identificar colonias que produzcan ácidos orgánicos, y por lo tanto cambien el pH. Cambios de púrpura a naranja indicaron disminución del pH debido a la protonización causada por la presencia de los ácidos orgánicos.

La muestra de suelo fue usada para preparar diluciones seriadas. Para ello, se pesaron 10 gramos, los que fueron colocados en una botella con 90 mililitros de agua de llave estéril (dilución 1/10). La suspensión de suelo fue agitada por 45 minutos. Una vez transcurrido éste tiempo, se prepararon las diluciones hasta llegar a  $1/10^6$ . Cien microlitros de las diluciones  $1/10^2$ ,  $1/10^3$ ,  $1/10^4$ ,  $1/10^5$ , y  $1/10^6$  fueron colocados y extendidos por cuadruplicado, sobre la superficie de las cajas petri que contenían los dos tipos diferentes de medio de cultivo. Los platos se incubaron por 15 días a  $25^\circ\text{C}$ .

Una vez transcurrido el tiempo se conto el número de colonias y se determinó el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (ufc/g), para esto se tomaron las cajas que presenten entre 30 y 300 colonias, y se calculó el valor usando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g suelo} = \frac{N \times FD \times V_t}{V_i \times S}$$

Donde

**N** Número de colonias.

**FD** Dilución en la cual se conto N (Ejemplo: si N se conto en la dilución 1/1000, FD =  $1 \times 10^3$ )

**V<sub>t</sub>** Volumen de la dilución 1/10, en mililitros.

**V<sub>i</sub>** Volumen inoculado en mililitros.

**S** Cantidad de suelo utilizado para preparar la dilución 1/10.

Se identifico también el número de colonias que fueron capaces de producir ácido.

## 1. Análisis estadístico.

Se uso un diseño completamente al azar (DCA), con 4 repeticiones. Se comparó los dos tipos diferentes de medios de cultivo (a1: medio de cultivo más púrpura de bromocresol; a2: medio de cultivo sin púrpura de bromocresol). La variable evaluada fue el número de ufc/g suelo. El esquema del análisis de varianza se presenta en la Tabla 2. En caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos, la separación de medias se realizo mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia.

**Tabla 2. Esquema del análisis de varianza del ensayo preliminar.**

Fuente de variación		Grados de libertad
Tratamientos	$(t - 1)$	1
Error	$t (r - 1)$	6
Total	$(r \times t) - 1$	7

## **B. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PRELIMINAR DE POSIBLES BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFORO**

### **1. Recolección y Caracterización de las Muestras de Suelo.**

Las muestras fueron recolectadas de cuatro lugares diferentes de la provincia de Chimborazo, tal como se reporta en la Tabla 3. En cada sitio, con la ayuda de un barreno estéril, se recolectaron los primeros 10 a 15 centímetros de suelo. Las muestras fueron trasferidas asépticamente a frascos estériles para su transporte. Una vez en el laboratorio, se procedió a homogeneizarlas mediante el uso de un mortero y pistilo, esterilizados con alcohol al 70%. Las muestras homogeneizadas fueron almacenadas en nuevos frascos estériles hasta su utilización en los experimentos de aislamiento selectivo.

**Tabla 3. Características generales de las muestras de suelo.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Lugar de Recolección</b>	<b>Tipo de Suelo</b>	<b>Observaciones</b>
A1	San Andrés	Arenoso	Pastos, superficie plana.
A2	Hacienda Tunshi	Franco arenoso	Suelo arado, rastrojo, superficie inclinada.
A3	Campus ESPOCH	Arena franca	Cultivo de brócoli, superficie plana.
A4	Cañi	Limoso	Cultivo de maíz, presenta horizonte B. Presencia de cutanes. Cima de loma.

## 2. Determinación de características físico químicas de los suelos.

### a. pH.

Se pesaron 20 gramos de suelo, los que se colocaron en un vaso de precipitación. Cincuenta mililitros de agua destilada fueron añadidos, para luego proceder a mezclar por cinco minutos con la ayuda de una cuchara. Finalmente las muestras fueron dejadas en reposo por media hora. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a tomar varias lecturas con la ayuda de un pHmetro. El valor final fue el promedio de las observaciones anotadas.

**b. Porcentaje de humedad y materia orgánica.**

Para la determinación del porcentaje de humedad se pesó previamente una cápsula de porcelana a la que se añadió 5 g de cada una de las muestras (Peso 1). Estas fueron colocadas posteriormente en la estufa a 105°C por 24 horas. Al término de este tiempo se dejó enfriar y se determinó el peso seco de la muestra (Peso 2). El porcentaje de humedad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% H = \frac{\text{Peso 1} - \text{Peso 2}}{\text{Peso 2}} \times 100\%$$

El suelo seco procedente de la estufa fue usado para determinar el contenido de materia orgánica. En un crisol se colocó una cantidad conocida de suelo seco (Peso 2). El crisol con suelo fue trasladado a una mufla y dejado allí a 400°C por 24 horas. Luego de transcurrido el tiempo se dejó enfriar y se calculó el peso final del suelo (Peso 3). El porcentaje de materia orgánica se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\% M.O = \frac{\text{Peso 2} - \text{Peso 3}}{\text{Peso 3}} \times 100\%$$

**3. Determinación de la posible población Bacteriana de solubilizadores de fósforo.**

Los resultados del ensayo preliminar permitieron establecer una metodología para el aislamiento de posibles bacterias solubilizadoras de fósforo, presentes en suelos recolectados en la provincia de Chimborazo. Para ello se decidió realizar diluciones seriadas de los suelos,

hasta llegar a la dilución  $1/10^8$ , inocular 100 uL de las diluciones  $1/10^4$ ,  $1/10^5$ ,  $1/10^6$ ,  $1 \times 10^7$ , y  $1 \times 10^8$ , por cuadruplicado, en el medio de cultivo que se reporta en el Anexo 1, y sin la adición de púrpura de bromocresol. El pH del medio fue ajustado a 7, y luego de la esterilización a  $121^\circ\text{C}$ , el medio fue enfriado para añadir nistatin a una concentración final de 75 ug/ml. Los platos inoculados fueron incubados a  $25^\circ\text{C}$  por ocho días. Transcurrido este tiempo se procedió a contar el número de colonias presentes en los platos de aislamiento y el número de colonias que presentaron solubilización visible del fosfato del medio de cultivo (presencia de halo). Con esos datos se calcularon el número de ufc/g suelo seco, para cada una de ellas, usando la fórmula descrita anteriormente, tomando en cuenta el valor de humedad. También se calculó el porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo al dividir el número de colonias con halos alrededor, para el número total de colonias presentes en el plato, y el resultado transformado a porcentaje.

**a. Análisis estadístico para la determinación de la población de las posibles bacterias solubilizadoras de fósforo.**

Se estableció un diseño completamente al azar (DCA), con 4 repeticiones. El único factor en estudio fue el lugar en el que las cuatro muestras de suelo fueron recolectadas en la provincia de Chimborazo (Tabla 4). Las variables evaluadas fueron el número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (ufc/g suelo, y el % de bacterias solubilizadoras. El esquema del análisis de varianza se presenta en la Tabla 3. Finalmente, en los casos en los que se encontró diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la separación de medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia.

**Tabla 4. Esquema del análisis de varianza para el experimento principal.**

<b>Fuente de variación</b>		<b>Grados de libertad</b>
Tratamientos	$(t - 1)$	3
Error	$t (r - 1)$	12
Total	$(r \times t) - 1$	15

**4. Aislamiento, purificación y almacenamiento de las posibles Bacterias solubilizadoras de fósforo.**

**a. Aislamiento y purificación.**

Los platos que presentaron crecimiento visible y diversidad de colonias de bacterias se escogieron para proceder con el aislamiento y purificación de las cepas. Con la ayuda de un palillo estéril se tomo una colonia, para inocularla mediante estría simple en platos tetrapetri que contenían agar nutritivo (AN). Los platos fueron incubados a 28°C por 72 horas. Aquellos cultivos que estaban puros fueron repicados en estría compuesta en nuevos platos con AN estéril. Aquellos que visualmente se hallaban contaminados fueron repicados hasta obtener cultivo puro

**b. Almacenamiento.**

Para todas las bacterias puras, se procedió a realizar suspensiones de células para su conservación a largo plazo. Para ello se procedió a transferir dos o más colonias de bacterias



en cultivo puro, a un criovial que contenía 750  $\mu$ l de una solución de glicerol al 20% (v/v). Finalmente, los tubos fueron colocados en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su conservación a largo plazo.

## **5. Caracterización microscópica de los microorganismos solubilizadores de fósforo.**

### **a. Caracterización microscópica.**

Los microorganismos fueron usados para preparar muestras que se observaron bajo el microscopio. Se determinó tamaño y forma de la célula bacteriana, y tinción de Gram, (Anexo 2).

## **C. DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA DE SOLUBILIZACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS.**

La determinación de la eficacia de solubilización se realizó en el mismo medio de aislamiento usado en los experimentos anteriores (Anexo 1), el que luego de la esterilización fue vertido en cajas tetrapetri. En cada división se procedió a inocular 10  $\mu$ l de la suspensión de bacterias almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las inoculaciones se repitieron cuatro veces. Posteriormente, los platos fueron incubados a  $28^{\circ}\text{C}$  por 8 días. Finalmente, luego de transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a medir el diámetro de la colonia y del halo de solubilización, en caso de existir. Con ésta prueba se logró identificar microorganismos que probablemente tienen el potencial de solubilización de fósforo insoluble en el suelo. La eficiencia en la solubilización se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de solubilización} = \frac{\text{Diámetro de la colonia(mm)} + \text{Diámetro del halo(mm)}}{\text{Diámetro de la colonia(mm)}}$$

### 1. **Análisis estadístico de la determinación de la eficacia de solubilización.**

Se usó un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones. El factor en estudio fue la eficiencia de solubilización del fósforo insoluble en el medio de cultivo. El esquema del análisis de varianza se muestra en la Tabla 5. La única variable evaluada fue el porcentaje de eficiencia de solubilización de fósforo, que presentaron los diferentes microorganismos que crecieron en los medios. El número de tratamientos se determinó en función del número de microorganismos aislados y purificados. Finalmente, la separación de medias fue realizada mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia.

**Tabla 5. Esquema del análisis de varianza para la eficacia de solubilización de fósforo insoluble.**

Fuente de variación		Grados de libertad
Tratamientos	(t – 1)	99
Error	t (r - 1)	300
Total	(r x t) - 1	399

## V. RESULTADOS

### A. ENSAYO PRELIMINAR

El número de ufc/g de suelo se muestra en la Tabla 6. El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 7). El coeficiente de variación del ensayo fue 10,60%. La separación de medias mostró que el tratamiento a2 (medio de aislamiento sin púrpura de bromocresol), permitió el crecimiento de un mayor número de colonias en los platos de aislamiento. En el tratamiento a1, el color del medio nunca cambió, por lo que no se pudo identificar colonias de bacterias que utilicen ácidos orgánicos como posible mecanismo de solubilización. Debido a que en el tratamiento a2 se obtuvo un mayor número de colonias, y a la imposibilidad de identificar producción de ácido mediante el cambio de color del medio debido a la presencia del indicador, se procedió a usar el medio de cultivo sin púrpura de bromocresol para los experimentos posteriores.

**Tabla 6. Número de ufc/g de posibles bacterias solubilizadoras de fósforo del experimento preliminar**

Tratamiento	Descripción	ufc/g
a1	Medio + púrpura de bromocresol	$4.1625 \times 10^8$
a2	Medio – púrpura de bromocresol	$5.8725 \times 10^8$

**Tabla 7. Análisis de varianza para el número de ufc/g de suelo en el ensayo preliminar.**

<b>Fuente de variación</b>	<b>g. l</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Probabilidad</b>
Tratamientos	1	$5.8482 \times 10^{16}$	$5.848 \times 10^{16}$	20.678	0.0039**
Error	6	$1,6970 \times 10^{16}$	$2.828 \times 10^{15}$		
Total	7	$7.5451 \times 10^{16}$			

## **B. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LAS MUESTRAS**

Los resultados del contenido de humedad, materia orgánica y pH de las muestras compuestas de los suelos agrícolas se encuentran en la Tabla 8. Los valores para el contenido de humedad presentaron valores entre 6,2% en el suelo recolectado en San Andrés hasta 30,8% en Cañí. Por otro lado, se determinó un pH alcalino (8,68) para la muestra recolectada en la ESPOCH. Las muestras de San Andrés (6,29) y Tunshi (7,3) presentaron valores neutros, mientras que en los suelos de Cañí se encontró un pH ligeramente ácido, con un valor de 5,7. En lo referente a la materia orgánica, los valores en general pueden ser considerados como bajos, ya que los valores variaron entre 0.5% (San Andrés) hasta 2.25% (Cañí).

**Tabla 8. Parámetros físicos químicos de las muestras de suelos.**

<b>Lugar de muestreo</b>	<b>pH</b>	<b>Humedad%</b>	<b>Materia orgánica (%)</b>
San Andrés	6,29	6,2	0,50
Tunshi	7,30	9,2	1,06
ESPOCH	8,68	9,8	0,75
Cañí	5,70	30,8	2,25

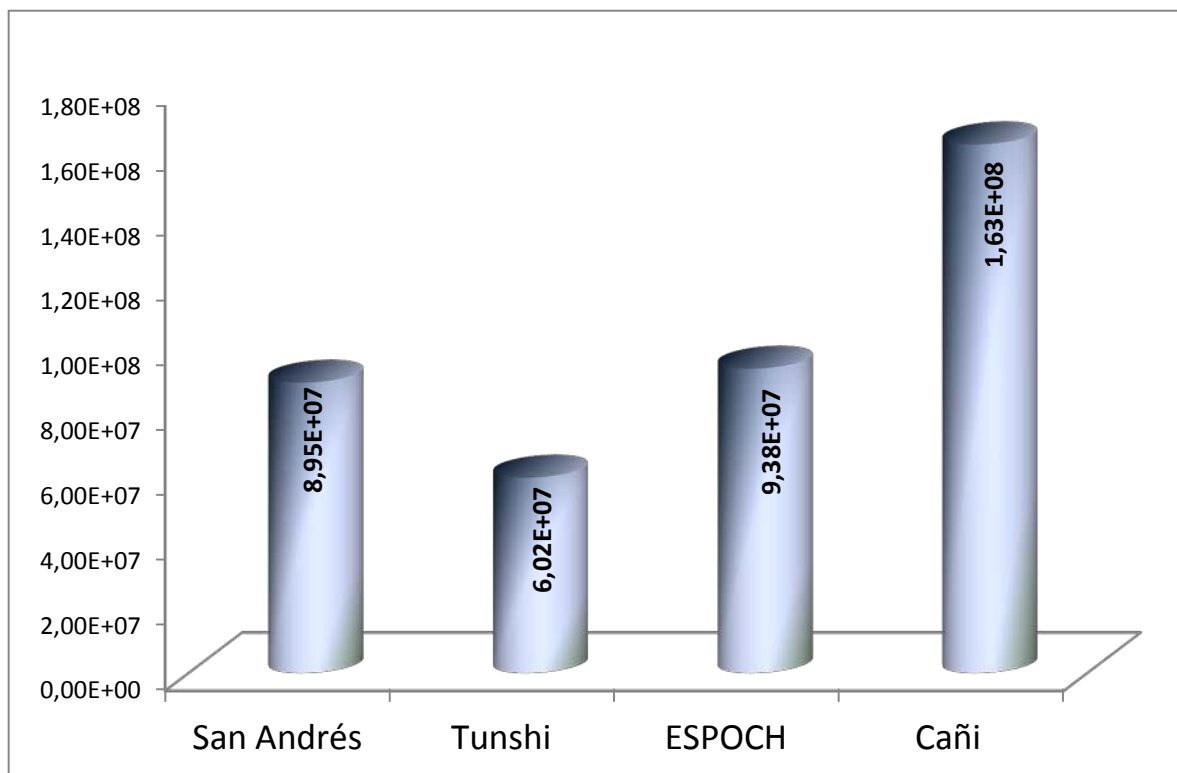
### C. DETERMINACION DE LA POBLACIÓN Y PORCENTAJE DE POSIBLES BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFORO.

#### 1. Determinación del número de unidades formadoras de colonias.

Los datos totales obtenidos en los experimentos se encuentran en el Anexo 3. En la Tabla 9 se muestran los valores del número de ufc/g de suelo seco, por sitio de recolección. Como se puede observar en la Grafico 1, el mayor número de ufc/g se obtuvo en los suelos recolectados en Cañí, mientras que la población más baja fue determinada para el suelo recolectado en Tunshi. Por otro lado, el análisis de varianza del logaritmo (base 10) del número de ufc/g de suelo seco, mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla 10). La prueba de Tukey separó las medias en dos niveles (Tabla 11), en donde el nivel máximo fue alcanzado por la población encontrada en Cañí con  $1.63 \times 10^8$  ufc/g de suelo seco, mientras que la menor fue la de Tunshi ( $6.02 \times 10^7$ ). El coeficiente de variación del experimento fue de 2.09%.

**Tabla 9. Número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo y suelo seco (ufc/g).**

Tratamiento	ID Lugar	ufc/g	Ufc/g suelo seco
a1	San Andrés	$8,39 \times 10^7$	$8,95 \times 10^7$
a2	Tunshi	$5,47 \times 10^7$	$6,02 \times 10^7$
a3	ESPOCH	$8,46 \times 10^7$	$9,38 \times 10^7$
a4	Cañí	$1,13 \times 10^8$	$1,63 \times 10^8$



**Grafico 1. Número de ufc/g de suelo seco por sitio de recolección**

**Tabla 10. Análisis de varianza para el número de unidades formadoras de colonias de bacterias por gramo de suelo seco (ufc/g) expresados en log base 10.**

Fuente de variación	g. l	SC	CM	Fc	Probabilidad
Tratamientos	3	0.380	0.127	7.338	0.005**
Error	12	0.207	0.017		
Total	15	0.587			

**Tabla 11. Separación de medias mediante la prueba de Tukey para el número de ufc/g de suelo seco.**

Tratamiento	Lugar Recolección	ufc/gramo de suelo seco	Rango
A4	Cañí	$1,63 \times 10^8$	a
A1	San Andrés	$8,95 \times 10^7$	ab
A3	ESPOCH	$9,38 \times 10^7$	ab
A2	Tunshi	$6,02 \times 10^7$	b

**2. Porcentaje de solubilizadores.**

El porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo presente en los platos de aislamiento se muestran en la Tabla 12. El análisis de varianza para el porcentaje de bacterias solubilizadores determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 13). El coeficiente de variación fue del 9,29%.

**Tabla 12. Porcentajes de bacterias solubilizadoras de fósforo en los platos de aislamiento.**

Tratamiento	Lugar Recolección	Porcentaje (%)
a1	San Andrés	83,31%
a2	Tunshi	76,35%
a3	ESPOCH	89,44%
a4	Cañí	90,07%

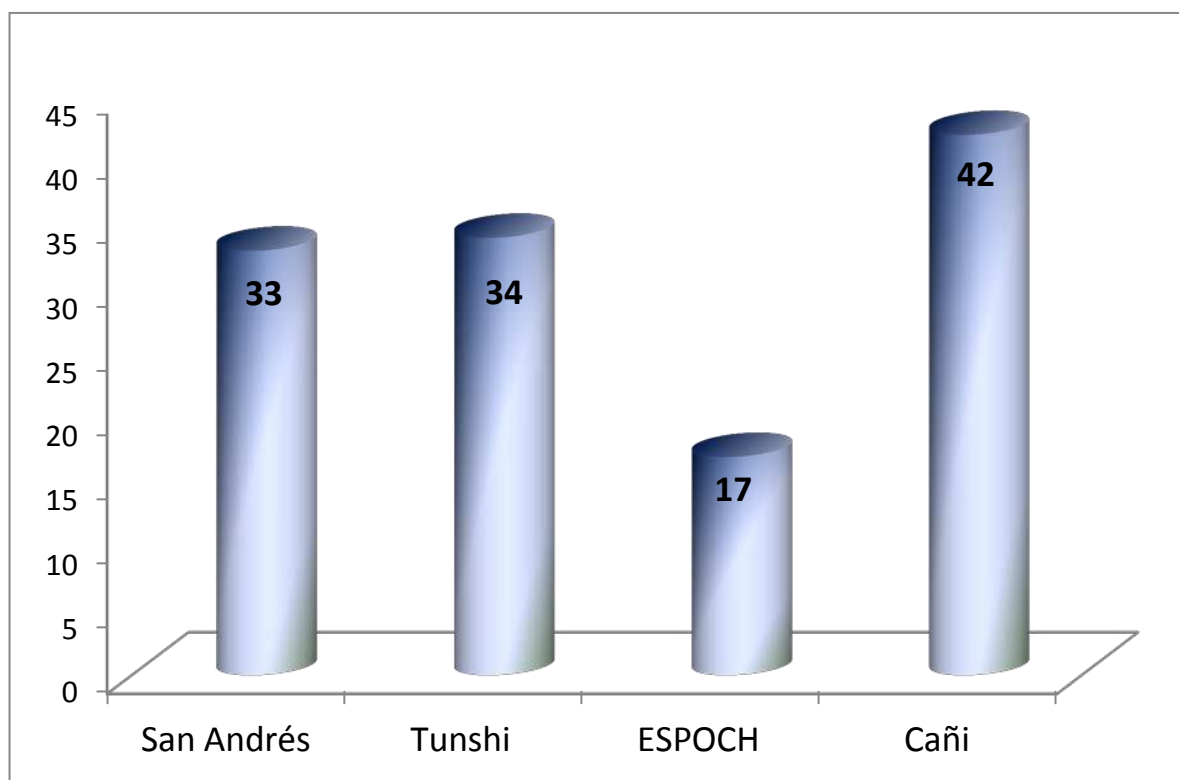
**Tabla 13. Análisis de varianza para el porcentaje de solubilizadores, en el aislamiento selectivo.**

<b>Fuente de variación</b>	<b>g. l</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Probabilidad</b>
Tratamientos	3	533.044	177.681	2.817	0.0842 ns
Error	12	756.873	63.073		
Total	15	1289.018			

#### **D. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS POSIBLES BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO**

A partir de los platos de aislamiento se logró aislar y purificar 126 cultivos de bacterias, las que fueron depositadas en la colección de cultivos del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH, desde el código DCB-1631 al DCB-1756 (Anexo 4), para su almacenamiento a largo plazo. En la Grafico 2 se muestra el número de cultivos por sitio de recolección. El mayor número fue obtenido a partir de la muestra compuesta de suelo recolectada en Cañí (42 cultivos), mientras que el número más bajo de aislamientos correspondió a los suelos de la ESPOCH (17 cultivos).

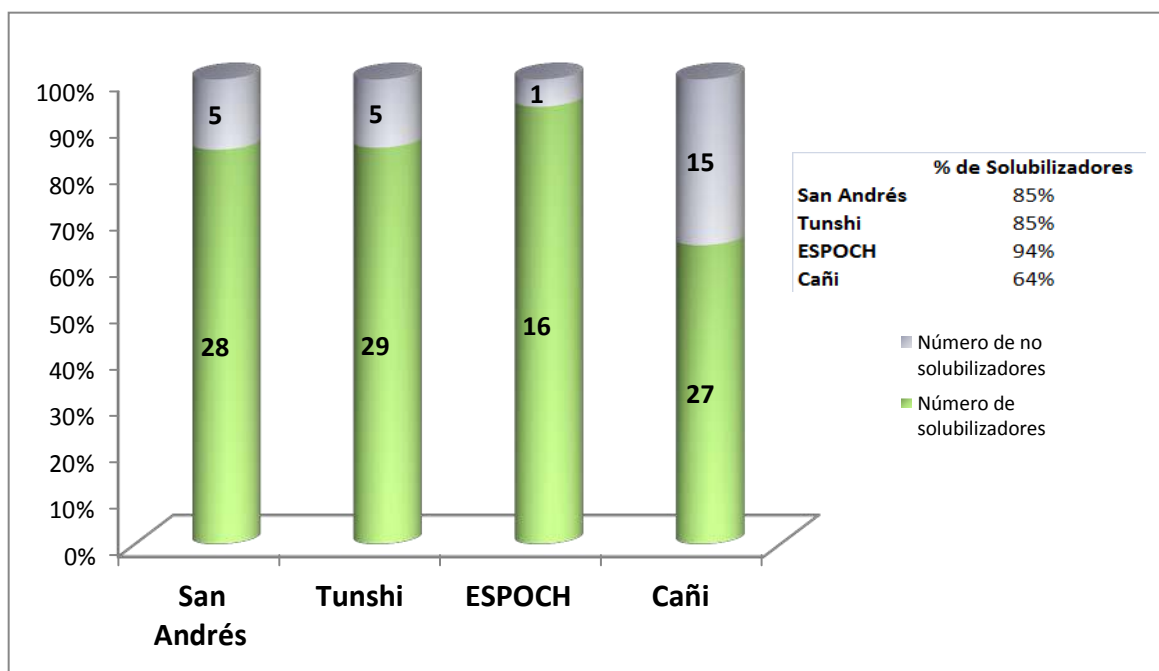




**Grafico 2. Número de aislamientos por sitio de recolección**

#### **E. DETERMINACION DEL INDICE DE SOLUBILIZACION DE FOSFORO INSOLUBLE**

Los diámetros de colonia y halos, así como el índice de solubilización alcanzado por las bacterias se muestran en el Anexo 4. De las 126 bacterias aisladas a partir de los suelos, solo 100 mostraron crecimiento y producción del halo de solubilización. La Grafico 3 muestra los resultados del número de bacterias solubilizadoras por sitio de recolección. El mayor número fue obtenido a partir de los suelos recolectados en Tunshi (29), seguido por San Andrés (28), Cañi (27) y por último la ESPOCH. Sin embargo, el mayor porcentaje de solubilizadores fue para los aislamientos obtenidos de la ESPOCH (94%), y el más bajo fue de Cañi (64%).



**Grafico 3. Número y porcentaje de bacterias solubilizadoras de fósforo por sitio de recolección.**

Por otro lado el análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Tabla 14). El coeficiente de variación fue de 10.53%. La separación de medias mediante Tukey al 5%, permitió obtener 6 niveles de significancia (Tabla 15). La bacteria DCB-1661 fue la que presentó el índice de solubilización más alto (5.050), mientras que el nivel más bajo fue calculado para la bacteria DCB-1644, con un índice de solubilización de 2.003.

**Tabla 14. Análisis de varianza para el índice de solubilización de bacterias aisladas del suelo.**

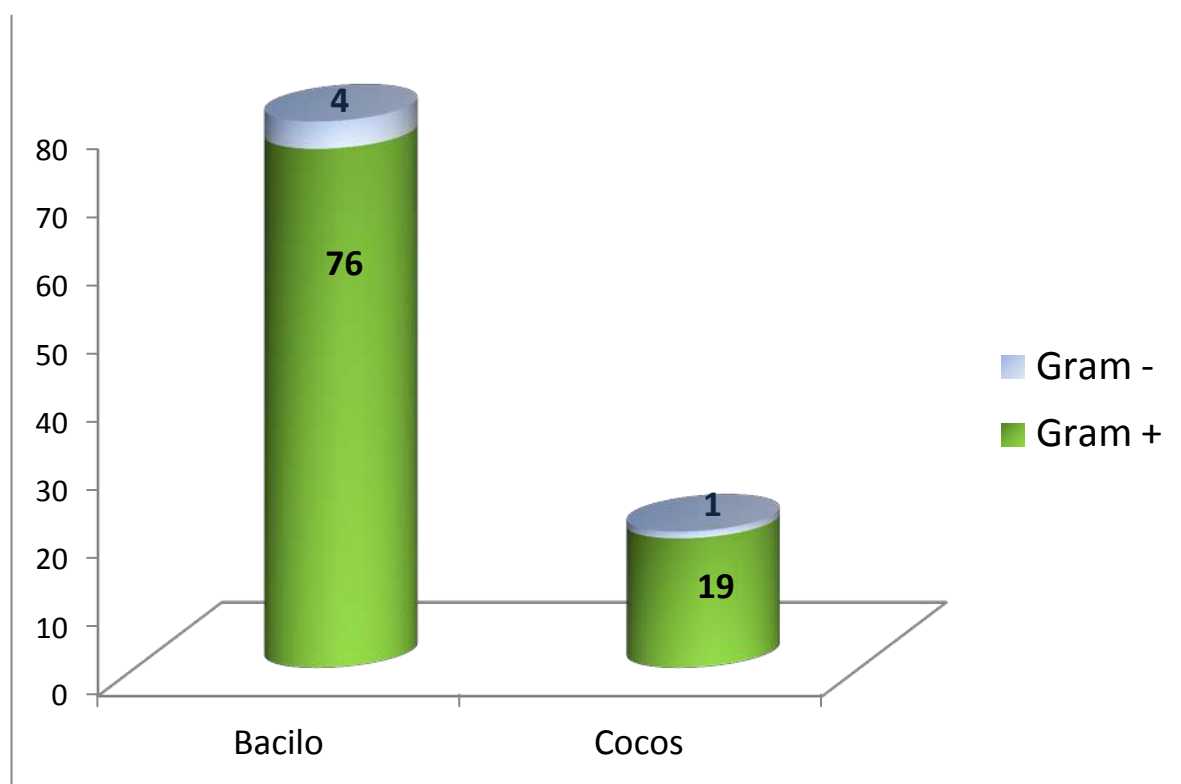
<b>Fuente de variación</b>	<b>g. l</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Probabilidad</b>
Tratamientos	99	135.350	1.367	23.101	0.00 **
Error	300	17.754	0.059		
Total	399	153.104			

**Tabla 15. Separación de medias para el índice de solubilización de las bacterias aisladas.**

<b>CODIGO</b>	<b>INDICE SOLUBILIZACION</b>	<b>NIVEL SIGNIFICANCIA</b>	<b>CODIGO</b>	<b>INDICE SOLUBILIZACION</b>	<b>NIVEL SIGNIFICANCIA</b>
DCB1661	5.050	A	DCB1650	2.115	F
DCB1648	4.730	AB	DCB1631	2.102	F
DCB1709	4.213	BC	DCB1678	2.100	F
DCB1739	4.032	BCD	DCB1717	2.100	F
DCB1647	3.977	BCD	DCB1703	2.098	F
DCB1653	3.870	CD	DCB1665	2.097	F
DCB1687	3.730	CD	DCB1701	2.095	F
DCB1659	3.650	CD	DCB1749	2.095	F
DCB1740	3.240	DE	DCB1675	2.092	F
DCB1690	2.563	EF	DCB1693	2.092	F
DCB1668	2.560	EF	DCB1756	2.092	F
DCB1634	2.545	EF	DCB1732	2.090	F
DCB1711	2.428	F	DCB1746	2.090	F
DCB1707	2.400	F	DCB1658	2.087	F
DCB1695	2.360	F	DCB1747	2.087	F
DCB1708	2.340	F	DCB1753	2.085	F
DCB1632	2.338	F	DCB1684	2.080	F
DCB1691	2.325	F	DCB1673	2.077	F
DCB1755	2.300	F	DCB1742	2.077	F
DCB1645	2.298	F	DCB1738	2.072	F
DCB1725	2.270	F	DCB1663	2.070	F
DCB1719	2.257	F	DCB1681	2.070	F
DCB1726	2.250	F	DCB1750	2.070	F
DCB1754	2.233	F	DCB1651	2.068	F
DCB1688	2.205	F	DCB1660	2.065	F
DCB1649	2.193	F	DCB1654	2.063	F
DCB1667	2.183	F	DCB1683	2.063	F
DCB1700	2.178	F	DCB1639	2.055	F
DCB1671	2.162	F	DCB1656	2.055	F
DCB1724	2.162	F	DCB1686	2.055	F
DCB1662	2.150	F	DCB1685	2.053	F
DCB1638	2.148	F	DCB1697	2.053	F
DCB1664	2.145	F	DCB1721	2.053	F
DCB1696	2.142	F	DCB1646	2.050	F
DCB1705	2.142	F	DCB1633	2.047	F
DCB1704	2.140	F	DCB1741	2.047	F
DCB1720	2.140	F	DCB1642	2.045	F
DCB1733	2.140	F	DCB1712	2.045	F
DCB1676	2.138	F	DCB1718	2.045	F
DCB1702	2.138	F	DCB1744	2.045	F
DCB1748	2.138	F	DCB1706	2.040	F
DCB1655	2.135	F	DCB1714	2.040	F
DCB1670	2.125	F	DCB1745	2.040	F
DCB1694	2.125	F	DCB1752	2.040	F
DCB1689	2.120	F	DCB1641	2.030	F
DCB1657	2.118	F	DCB1643	2.030	F
DCB1722	2.118	F	DCB1743	2.030	F
DCB1735	2.118	F	DCB1698	2.027	F
DCB1680	2.117	F	DCB1652	2.017	F
DCB1640	2.115	F	DCB1644	2.003	F

## F. CARACTERIZACION MICROSCOPICA DE LOS AISLAMIENTOS

De las 100 bacterias que demostraron capacidad de solubilización de fósforo en condiciones *in vitro*, ochenta presentaron una forma bacilar, mientras que 20 fueron identificadas como cocos (Grafico 4). Así mismo, los resultados de la reacción de gram determinaron que la mayoría de las bacterias fueron gram positivas (95), mientras que solamente cinco fueron gram negativas. Las dimensiones de cada bacteria y datos relacionados a la caracterización microscópica se muestran en el Anexo 5.



**Grafico 4. Número de bacterias según la forma de la célula y reacción de Gram.**

## VI. DISCUSION.

Las bacterias solubilizadoras de fósforo presentan características morfológicas diversas. Pueden ser gram positivas o gram negativas, mostrar características bacilares o cocoides. Principalmente se hallan presentes en abonos y suelos ricos en materia orgánica. Estas bacterias intervienen en ciclo del fósforo, transformando formas insolubles a formas asimilables en la rizosfera. Los mecanismos relacionados a la solubilización están relacionados a la producción de ácidos orgánicos y enzimas extracelulares, y a la incorporación del fósforo en la célula bacteriana por medio de su metabolismo.

El presente estudio se enfocó a la identificación de bacterias con posible capacidad de solubilización de fósforo insoluble, que posteriormente puedan ser usadas como biofertilizantes en agricultura. Para ese fin, se logró determinar un medio de aislamiento que permita la fácil identificación de estas bacterias, en los mismos platos. Fundamentalmente se uso en la composición del medio, una forma de fosfato insoluble (fósforo tricálcico), el que obligatoriamente debió ser solubilizado por las bacterias para permitir su crecimiento. Así mismo, en el experimento preliminar se uso púrpura de bromocresol en el medio, como indicador de cambios de pH, para identificar rápidamente a aquellas bacterias que solubilizan fósforo mediante la producción de ácidos orgánicos. Sin embargo, en el procedimiento final, ésta idea fue descartada, ya que no existió evidencia de cambios de pH, e incluso, la presencia del colorante impidió observar los halos de solubilización.

Ya en el experimento central, los números de posibles bacterias solubilizadoras fueron altos, ya que en todos los suelos se encontraron poblaciones mayores a  $1 \times 10^7$  ufc/g de suelo. Posiblemente la presencia de materia orgánica, y el hecho de que todos eran suelos dedicados a agricultura, con posibles adiciones de fertilización fosfatada, influyó en éste aspecto. El pH

no influyó en la población, a pesar de existir diferencias evidentes entre los valores obtenidos de los diferentes suelos. También es evidente que éstas características fisicoquímicas, no influyeron en el porcentaje de solubilizadores, ya que no se encontraron diferencias estadísticas entre los suelos estudiados. En todo caso, el porcentaje de solubilizadores es alto.

Por otro lado, el índice de solubilización arrojó resultados interesantes, ya que 100 de los 126 aislamientos demostraron poseer mecanismos para solubilizar fósforo insoluble, lo que indica que prácticamente más del 80% de los cultivos presentaron ésta característica. De éstos, cinco cultivos (DCB-1661, DCB-1648, DCB-1709, DCB-1739, y DCB-1647), se ubicaron en los dos primeros niveles de significancia estadística, por lo que deberían ser utilizados para estudios posteriores de eficiencia de solubilización en maceta y finalmente en campo. También es posible notar que 88 cultivos se ubicaron en el último nivel de significancia, lo que posiblemente nos indica la presencia de muchas bacterias solubilizadoras en el suelo, pero que no tienen una eficiencia muy grande dentro del proceso. Esto podría explicar por qué, a pesar de encontrarse una fracción alta de solubilizadores en el suelo, no son suficiente para brindar a las plantas la provisión de fósforo necesario para su desarrollo normal. En la gran mayoría de cultivos extensivos, es necesario una o varias fertilizaciones de fósforo, para evitar problemas de deficiencia.

Es evidente que éste estudio ha permitido obtener resultados alentadores relacionados a la búsqueda de bacterias eficientes en la solubilización de fósforo. El potencial que éste tipo de bacterias poseen podría ser usado en la elaboración de un bioproducto útil para agricultura, el mismo que sería beneficioso, no solamente para los agricultores, debido a la disminución de costos de fertilizantes, sino también al ambiente porque evitaría la acumulación de fertilizantes en el suelo, favoreciendo así a la conservación del medioambiente.

## **VII. CONCLUSIONES.**

- A.** Ciento veinte y seis bacterias fueron aisladas en cultivo puro, de las cuales solamente 100 presentaron solubilización del fosforo insoluble del medio de cultivo.
  
- B.** En los cuatro suelos estudiados se encontró una población relativamente alta de posibles bacterias solubilizadoras de fósforo. La población más alta fue obtenida en Cañí, mientras que Tunshi presentó la población más baja.
  
- C.** La bacteria DCB1661 presentó el mayor índice de solubilización in vitro con un valor de 5.05.
  
- D.** La mayor parte de los aislamientos presentaron forma bacilar con tinción gram positiva.



## **VIII. RECOMENDACIONES.**

- A.** Realizar nuevos muestreos en zonas diferentes para ampliar la colección de bacterias solubilizadoras de fosfatos insolubles.
  
- B.** Probar en condiciones de campo las bacterias que mostraron mayor capacidad solubilizadora.
  
- C.** Introducir los medios de cultivo diferenciados en los estudios microbiológicos de suelos del departamento para establecer la diversidad microbiana que presentan.

## **IX. RESUMEN.**

La presente investigación propone: aislar y caracterizar bacterias solubilizadoras de fosforo a partir de cuatro suelos de la provincia de Chimborazo, se realizaron aislamientos selectivos con la utilización de un medio específico para estas bacterias, en el laboratorio de Ciencias Biológicas de la facultad de Recursos Naturales. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones para la evaluación del número de unidades formadoras de colonia por gramo de suelo que presentaron las cuatro muestras, se realizó la purificación, almacenamiento, evaluación del índice de solubilización de las bacterias y posterior caracterización microscópica. Dando como resultado el aislamiento de 100 bacterias solubilizadoras de fosforo a partir de 4 muestras compuestas las que fueron purificadas y almacenadas en crio preservación en la colección de microorganismos, se obtuvo también 6 niveles de significancia para los índices de solubilización de las bacterias estudiadas, la de mayor índice fue la bacteria 1661 con 5.05. La evaluación del número de ufc por gramo de suelo tuvo diferencias significativas siendo el suelo de Cañí el mejor según la prueba de Tukey. En la caracterización microscópica se pudo constatar la presencia mayoritaria de bacterias de forma bacilar Gram positiva. Concluyendo que en los cuatro suelos estudiados presentaron una población relativamente alta de posibles bacterias solubilizadoras de fósforo. La población más alta fue obtenida en Cañí. La bacteria DCB1661 presentó el mayor índice de solubilización in vitro con un valor de 5.05. Se recomienda introducir medios de cultivo diferenciados en los estudios microbiológicos de suelos del departamento para establecer la diversidad microbiana que presentan.

## **X. SUMARY.**

The present investigation proposes to isolate and to characterize solubilization phosphorus bacteria from four types of lands from Chimborazo Province.

Selective isolations were done with the use of a specific way for these bacteria in the biological sciences laboratory of the natural resources faculty. A design completely at random was used with four repetitions for the evaluation of the number of colony former units by gram of lands that presented the four samples. The purification, storage and index evaluation were done of the bacteria solubilization and later microscopic characterization.

Giving as result the isolation of 100 solubilization phosphorus bacteria from 5 compound samples, that were purified and stored in raising preservation in the collection of microorganisms; also 6 levels of significance were obtained for the indices of solubilization of the studied bacteria, the one with greatest index was bacterium 1661 with 5.05. The evaluation of the number ufc by gram of ground had significant differences, being the ground of cañi the best one according to the Tukey test. In the microscopic characterization, the majority presence of bacteria could be stated of vacillate form gram positive.

It is concluded that the four studied grounds presented a relatively high population of possible solubilization phosphorus bacteria. The highest population was obtained in cañi. Bacterium DCB1661 showed the greatest solubilization index in vitro with a value of 5.05. it is recommended to introduce differentiated farming means in the microbiological studies of the department lands to establish their microbial diversity.

## **XI. BIBLIOGRAFIA**

1. DIANA FERNANDA VERA, HERNANDO PÉREZ.2002. Aislamiento de hongos solubilizadores de fosfato se la rizosfera de Arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae) COLOMBIA.
2. YERLY M. USECHE<sup>1</sup>, HERNANDO VALENCIA<sup>1</sup>, HERNANDO PÉREZ.2004 Caracterización de bacterias y hongos solubilizadores de fosfato bajo tres usos de suelo en el sur del trapezio Amazónico. COLOMBIA.
3. LUIS A. GARASSINI.1967. Microbiología agraria. VENEZUELA.
4. GROS, A. 1996. Guía práctica de la fertilización. Editorial Limusa. ESPAÑA.
5. GUERRERO, A. 1990. El suelo, los abonos y la fertilización de los cultivos. Edición mundi prensa. España.
6. TISDALE, S Y WERNER, N. (1988). Fertilidad de Suelos y Fertilizantes. Editorial Limusa. p.p. 144-150.
7. ISBELIA REYES (1991). Dinámica del fósforo y aislamiento de algunos microorganismos en la mezcla pulpa de café-roca fosfórica. VENEZUELA.
8. ARZUAGA, S; FERNANDEZ,C; DALURZO, H; VAZQUEZ, S. 2005. Fosforo total, fosforo orgánico y fosfatasa acida en Entisoles, Alfisoles y Vertisoles de corriente con diferentes usos agrícolas. Comunicaciones científicas y tecnológicas. Resumen A-066.
9. BARRAGAN, C; ZAMBRANO, D. PEDROZA, A. BOLILLA, R 2003.Produccion de bacterias fosfato Solubilizadoras mediante fermentación Discontinua en Caldo Pikovskaya modificado .COLOMBIA.
10. IRMA GOMEZ; MAGALIS ZABALA, 2001 Determinación de la capacidad solubilizadora de fosforo en hongos aislados de la rizósfera del Maní. MEXICO.

11. EDI-PREMONO, M.A. MOAWAD, y P.L.G. VLECK, 1996. Effect of phosphate solubilizing *Pseudomona putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere.
12. MARTA NIKLITSCHKEK. Aislamiento e identificación de bacterias solubilizadores de fosforo de la rizosfera de especies arbustivas silvestres de la decima región. CHILE.
13. MADIGAN M. MARTINGO J.PARKER J.2001. Biología de los microorganismos. Octava edición.
14. OTALORA J.PATÍÑO L., MARTINEZ M, PEDROZA A. 20003.Estandarizacion de una técnica cuantitativa de producción de fosfatasas producidas a través de microorganismos solubilizadores de fosfato. Bogotá (COLOMBIA).
15. Dik W CHENG L. WANG P.2000.Soil acid alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators.
16. MARIO DELGADO.2002 Los microorganismos del suelo en la nutrición vegetal. Informes técnicos.
17. CATALINA B y RINCON S. 2008. Aislamiento y evaluación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos plaza. Bogotá, (COLOMBIA).
18. MILTHOPE Y MOORBY. 1982. Introducción a la fisiología de cultivos. Primera edicion. MEXICO.
19. RIGDE E, ROVIRA A, 1971. Phosphatase activitt of intact young wheat roots under sterile and non sterile conditions.
20. PICONE L. ZAMUNER E. 2002.Fosforo orgánico y fertilidad fosfórica. Informaciones Agronomicas del Cono sur.

21. HYLAND C. KETTERINGS Q. DEWING D. STOCKIN R. CZYMMEK K. 2005.  
Phosphorus basics.

## **XII.     ANEXOS**

# **ANEXO 1**

## **MEDIOS DE CULTIVO**



**Tabla 1. Medio de cultivo a1 para el aislamiento selectivo de bacterias solubilizadoras de fosforo en el ensayo preliminar.**

<b>Componentes del medio</b>	<b>Cantidad para 1Lt de medio</b>
Glucosa	4gr
Cloruro de sodio	0,2gr
Fosfato tribásico	2,5gr
Nitrato potasio	2gr
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,5mg
MnSO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2,5mg
Sulfato de hierro	2,5mg
Agar	15gr

Elaborado por: Esteban Guzmán, 2011.

**Tabla 2. Medio de cultivo a2 para el aislamiento selectivo de bacterias solubilizadoras de fosforo en el ensayo preliminar.**

<b>Componentes del medio</b>	<b>Cantidad para 1Lt de medio</b>
Glucosa	4gr
Cloruro de sodio	0,2gr
Fosfato tribásico	2,5gr
Nitrato potasio	2gr
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,5mg
MnSO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2,5mg
Sulfato de hierro	2,5mg
Agar	15gr
Purpura de bromocresol	0,1gr

Elaborado por: Esteban Guzmán, 2011

# **ANEXO 2**

## **PROCEDIMIENTO PARA LA TINCION DE GRAM.**

**Procedimiento para la tinción de gram.**

1. Recogemos una muestra de bacterias con un palillo estéril de la caja petri de cultivo puro.
2. Colocamos el inóculo en un porta objetos y realizamos un frotis.
3. Secamos el frotis y luego fijamos la muestra pasándola por el mechero.
4. Colocamos violeta de cristal en la placa y dejamos reposar por un minuto.
5. Posteriormente se realiza un lavado con agua destilada, para luego colocar alcohol yodado en la muestra y dejamos reposar por 5 minutos.
6. Colocamos safranina por 2 minutos.
7. Transcurrido este tiempo lavamos con agua destilada y posteriormente dejamos que la placa se seque para llevarla al microscopio para su observación.
8. Células con coloración púrpura fueron consideradas como gram positivas y aquellas coloreadas de rosado o rojo, como gram negativas.

# **ANEXO 3**

## **DATOS EXPERIMENTALES**

**Tabla 1. Número de unidades formadoras de colonia por plato petri en el aislamiento selectivo.**

<b>MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES UFC. /POR PLATO PETRI.</b>					
<b>Muestra</b>	<b>Dilución</b>	<b>r1</b>	<b>r2</b>	<b>r3</b>	<b>r4</b>
<b>San Andrés</b>	10000	60	116	72	125
<b>San Andrés</b>	100000	22	36	17	23
<b>Tunshi</b>	10000	42	61	62	78
<b>Tunshi</b>	100000	25	41	37	28
<b>ESPOCH</b>	10000	78	111	62	125
<b>ESPOCH</b>	100000	10	37	8	29
<b>Cañí</b>	10000	166	138	95	102
<b>Cañí</b>	100000	26	38	21	29

Elaborado por: Esteban Guzmán, 2011.

**Tabla 2. Datos totales del aislamiento selectivo (ufc/gr de suelo).**

<b>MICROORGANISMOS SOLUBILIZADORES UFC/gr de suelo</b>					
<b>Muestra</b>	<b>Dilución</b>	<b>r1</b>	<b>r2</b>	<b>r3</b>	<b>r4</b>
<b>San Andrés</b>	10000	5,40E+07	1,04E+08	6,48E+07	1,13E+08
<b>San Andrés</b>	100000	1,98E+08	3,24E+08	1,53E+08	2,07E+08
<b>Tunshi</b>	10000	3,78E+07	5,49E+07	5,58E+07	7,02E+07
<b>Tunshi</b>	100000	2,25E+08	3,69E+08	3,33E+08	2,52E+08
<b>ESPOCH</b>	10000	7,02E+07	9,99E+07	5,58E+07	1,13E+08
<b>ESPOCH</b>	100000	9,00E+07	3,33E+08	7,20E+07	2,61E+08
<b>Cañí</b>	10000	1,49E+08	1,24E+08	8,55E+07	9,18E+07
<b>Cañí</b>	100000	2,34E+08	3,42E+08	1,89E+08	2,61E+08

Elaborado por: Esteban Guzmán, 2011.

**ANEXO 4**

**CODIGOS DE  
ALMACENAMIENTO Y  
RESULTADOS DE  
SOLUBILIZACION DE LAS  
BACTERIAS**

**Tabla 1. Diámetro de la colonia, halo e índice de solubilización.**

C. ALMACENAMIENT O		DIAMETRO DE LA COLONIA				DIAMETRO DEL HALO DE SOLUBILIZACION				INDICE DE SOLUBILIZACION.			
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
DCB	1631	4,5	5,3	4,5	5	5	5,2	5,5	5,5	2,11	1,98	2,22	2,10
DCB	1632	7	7	7,2	10	10	10	10	11	2,43	2,43	2,39	2,10
DCB	1633	8	8,5	8,8	10	7	7,2	12	11	1,88	1,85	2,36	2,10
DCB	1634	3	3	4	5	4	4	8	7,6	2,33	2,33	3,00	2,52
DCB	1638	3	6	3,5	6,8	3,6	3,4	6,5	6,5	2,20	1,57	2,86	1,96
DCB	1639	5,9	6	6	7	6	6,3	6,5	7,5	2,02	2,05	2,08	2,07
DCB	1640	10	8	7	8	7	7,5	10,1	11	1,70	1,94	2,44	2,38
DCB	1641	5	5	6	6	5,1	5,3	6,1	6,1	2,02	2,06	2,02	2,02
DCB	1642	8	12,5	8,2	9	8,2	8,6	11,5	9,5	2,03	1,69	2,40	2,06
DCB	1643	16	16	16,5	16	16,5	17	16,5	16,5	2,03	2,06	2,00	2,03
DCB	1644	23	23	23,2	23	23,1	23,3	23,1	23,1	2,00	2,01	2,00	2,00
DCB	1645	5,1	9	5,1	7,5	7,5	7,5	9	8,5	2,47	1,83	2,76	2,13
DCB	1646	18	18	19	18	19	19,5	19	19	2,06	2,08	2,00	2,06
DCB	1647	8	8	9	8	22	24	25	27	3,75	4,00	3,78	4,38
DCB	1648	6	6	7	6	23	23,8	23	23	4,83	4,97	4,29	4,83
DCB	1649	5	6,5	4	5,5	6	5,5	6,5	6	2,20	1,85	2,63	2,09
DCB	1650	7	8	8	7,5	7,5	8,5	9	9	2,07	2,06	2,13	2,20
DCB	1651	12	17	12	15	12,1	12,1	17	17	2,01	1,71	2,42	2,13
DCB	1652	13	13	13	13	13,1	13,5	13,1	13,1	2,01	2,04	2,01	2,01
DCB	1653	5,5	6	6	5,5	16	17	17	16	3,91	3,83	3,83	3,91

Elaborado por: Esteban Guzmán, 2011.

**Tabla 1. Continuación.....**

<b>DCB 1654</b>	11	17	11	15	11,5	11,5	16	16	2,05	1,68	2,45	2,07
<b>DCB 1655</b>	5,1	6	5,5	5,1	6	6	6,5	6	2,18	2,00	2,18	2,18
<b>DCB 1656</b>	13	10,8	13	13	13	14	11,5	13,5	2,00	2,30	1,88	2,04
<b>DCB 1657</b>	7	8,5	6,9	7	7,5	7,5	10	7,5	2,07	1,88	2,45	2,07
<b>DCB 1658</b>	6,5	7,8	6,5	9	7,1	7,2	8	10	2,09	1,92	2,23	2,11
<b>DCB 1659</b>	5	5	5	5	13	14	13	13	3,60	3,80	3,60	3,60
<b>DCB 1660</b>	6	6	6	6	6,1	6,5	6,5	6,5	2,02	2,08	2,08	2,08
<b>DCB 1661</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	2	2,1	2	2	5,00	5,20	5,00	5,00
<b>DCB 1662</b>	5,3	6,2	5,3	6	6	6,1	7	7	2,13	1,98	2,32	2,17
<b>DCB 1663</b>	5	5	5	5	5,3	5,5	5,3	5,3	2,06	2,10	2,06	2,06
<b>DCB 1664</b>	6,5	7,5	6,7	6,5	7	7	8	9	2,08	1,93	2,19	2,38
<b>DCB 1665</b>	5,5	5,5	5,5	6,5	6	6,2	6	7	2,09	2,13	2,09	2,08
<b>DCB 1667</b>	6	6	6	6	7	7,3	7	7	2,17	2,22	2,17	2,17
<b>DCB 1668</b>	11	11	11	11	17	17,5	17	17	2,55	2,59	2,55	2,55
<b>DCB 1670</b>	4,7	5,2	4,7	5	5	5	6	6	2,06	1,96	2,28	2,20
<b>DCB 1671</b>	6,6	11	6,6	8,5	8,1	8,5	10,5	9	2,23	1,77	2,59	2,06
<b>DCB 1673</b>	6	7,8	6	7,5	6,5	6,5	8	8	2,08	1,83	2,33	2,07
<b>DCB 1675</b>	5	7	5	6,5	5,5	5,5	7	7	2,10	1,79	2,40	2,08
<b>DCB 1676</b>	5,5	8	5,5	7,5	6,5	6,8	8	8	2,18	1,85	2,45	2,07
<b>DCB 1678</b>	5,5	5,5	5,5	5,5	6	6,2	6	6	2,09	2,13	2,09	2,09
<b>DCB 1680</b>	6	6,5	8,5	9	7	7,3	9,5	9,5	2,17	2,12	2,12	2,06
<b>DCB 1681</b>	7	11	8	11	7,5	7,5	11,5	12	2,07	1,68	2,44	2,09

Elaborado por: Esteban Guzmán, 2011.



Tabla 1. Continuación.....

<b>DCB 1683</b>	5,9	5,9	5,9	5,9	6,2	6,5	6,2	6,2	2,05	2,10	2,05	2,05
<b>DCB 1684</b>	6,5	7	6,5	8	7	7,2	7,5	8,5	2,08	2,03	2,15	2,06
<b>DCB 1685</b>	10	12	10	12	11	10	11,5	13,5	2,10	1,83	2,15	2,13
<b>DCB 1686</b>	5	5	5	5	5,2	5,5	5,2	5,2	2,04	2,10	2,04	2,04
<b>DCB 1687</b>	6	6	6	5,5	15	15	17	17	3,50	3,50	3,83	4,09
<b>DCB 1688</b>	7	8,5	7	9	8	8,5	11	10	2,14	2,00	2,57	2,11
<b>DCB 1689</b>	5	5,5	5	5,5	5,5	6	6	6	2,10	2,09	2,20	2,09
<b>DCB 1690</b>	5	5	5,5	5	8	8	8	8	2,60	2,60	2,45	2,60
<b>DCB 1691</b>	5	5	5	5	6,5	7	6,5	6,5	2,30	2,40	2,30	2,30
<b>DCB 1693</b>	9	11	12	13	10,1	11	14,5	13,5	2,12	2,00	2,21	2,04
<b>DCB 1694</b>	5,5	5,5	5,5	6	6	6,3	6	7	2,09	2,15	2,09	2,17
<b>DCB 1695</b>	5,5	5,5	5,5	5,5	7,5	7,5	7,5	7,5	2,36	2,36	2,36	2,36
<b>DCB 1696</b>	5	6	5	6	5,5	6	6,5	7	2,10	2,00	2,30	2,17
<b>DCB 1697</b>	9	9	7,5	12	7,5	7,3	11,5	12,5	1,83	1,81	2,53	2,04
<b>DCB 1698</b>	7,8	10,5	7,8	10	8	8,2	10	10,2	2,03	1,78	2,28	2,02
<b>DCB 1700</b>	8	8	8	11	8,5	8,5	12	12	2,06	2,06	2,50	2,09
<b>DCB 1701</b>	5,5	7,5	6	5	6	6,3	7,5	6	2,09	1,84	2,25	2,20
<b>DCB 1702</b>	10	10	10	10	11,5	11	11,5	11,5	2,15	2,10	2,15	2,15
<b>DCB 1703</b>	8	10,5	8	11	9	9,5	10,5	11,5	2,13	1,90	2,31	2,05
<b>DCB 1704</b>	5	5	5	5	5,6	6	5,6	5,6	2,12	2,20	2,12	2,12
<b>DCB 1705</b>	5	6	5	6	5,5	6	6,5	7	2,10	2,00	2,30	2,17
<b>DCB 1706</b>	5	5	5	5	5,1	5,5	5,1	5,1	2,02	2,10	2,02	2,02

Elaborado por: Esteban Guzmán, 2011.

**Tabla 1. Continuación.....**

<b>DCB 1707</b>	5	5	5	5	7	7	7	7	2,40	2,40	2,40	2,40
<b>DCB 1708</b>	6	6	6	6	8	8,2	8	8	2,33	2,37	2,33	2,33
<b>DCB 1709</b>	6	5	5,5	6	12	12,5	23	25	3,00	3,50	5,18	5,17
<b>DCB 1711</b>	4,1	6,2	4,1	5,5	5,5	6	8	8	2,34	1,97	2,95	2,45
<b>DCB 1712</b>	6,9	8,5	6,9	9	7	7,5	8,5	9,5	2,01	1,88	2,23	2,06
<b>DCB 1714</b>	15	15	15	15	15,5	16	15,5	15,5	2,03	2,07	2,03	2,03
<b>DCB 1717</b>	6	6,5	6	7	6,5	7	7	7,5	2,08	2,08	2,17	2,07
<b>DCB 1718</b>	5	5,8	5	6	5,1	5,1	6	6,5	2,02	1,88	2,20	2,08
<b>DCB 1719</b>	6	7,5	6	7	7	7	9	10	2,17	1,93	2,50	2,43
<b>DCB 1720</b>	5	6,5	5	5,5	5,1	5,5	8	6	2,02	1,85	2,60	2,09
<b>DCB 1721</b>	4	5,2	4	4	4,1	4,5	5,1	4,1	2,03	1,87	2,28	2,03
<b>DCB 1722</b>	7,5	9	7,5	8,5	8	8	10	10	2,07	1,89	2,33	2,18
<b>DCB 1723</b>	5,5	5,5	5,5	5,5	6	6	6	6	2,09	2,09	2,09	2,09
<b>DCB 1724</b>	4,9	6,3	4,9	6	5,9	5,9	6,5	6,5	2,20	1,94	2,33	2,08
<b>DCB 1725</b>	6,5	8,8	6,5	11	8,1	8,5	11,5	12	2,25	1,97	2,77	2,09
<b>DCB 1726</b>	4	4	4	4	5	5	5	5	2,25	2,25	2,25	2,25
<b>DCB 1732</b>	4,6	4,6	4,6	4,6	5	5	5	5	2,09	2,09	2,09	2,09
<b>DCB 1733</b>	7	7	7	7	8	8	8	8	2,14	2,14	2,14	2,14
<b>DCB 1735</b>	5	10,5	5,2	7	6	6	8,5	7,5	2,20	1,57	2,63	2,07
<b>DCB 1738</b>	7	7	7	7	7,5	7,5	7,5	7,5	2,07	2,07	2,07	2,07
<b>DCB 1739</b>	7	5	6	5,5	16	16	18	20	3,29	4,20	4,00	4,64
<b>DCB 1740</b>	5,1	5,8	5,3	5,5	10,1	10,5	12	16	2,98	2,81	3,26	3,91

Elaborado por: Esteban Guzmán, 2011.

**Tabla 1. Continuación.....**

<b>DCB 1741</b>	5,9	6,8	5,9	7	6	6,2	7	7,5	2,02	1,91	2,19	2,07
<b>DCB 1742</b>	6,5	8,5	6,5	7	7,1	7,1	8,5	7,5	2,09	1,84	2,31	2,07
<b>DCB 1743</b>	7,9	7,9	7,9	7,9	8,1	8,1	8,1	8,1	2,03	2,03	2,03	2,03
<b>DCB 1744</b>	5	6,5	5	6	5,1	5,1	6,5	6,5	2,02	1,78	2,30	2,08
<b>DCB 1745</b>	7	10	7	9	7,1	7,3	9,5	9,5	2,01	1,73	2,36	2,06
<b>DCB 1746</b>	5,5	5,5	5,5	5,5	6	6	6	6	2,09	2,09	2,09	2,09
<b>DCB 1747</b>	5	6,3	5	6	5,5	5,5	6,5	6,5	2,10	1,87	2,30	2,08
<b>DCB 1748</b>	4,5	5,8	4,5	5	5	5,3	6	6	2,11	1,91	2,33	2,20
<b>DCB 1749</b>	6	9,5	6	8,5	6,5	7	9	9	2,08	1,74	2,50	2,06
<b>DCB 1750</b>	6	9	6	8	6,5	6,5	8,5	8,5	2,08	1,72	2,42	2,06
<b>DCB 1752</b>	5	5	5	5	5,1	5,5	5,1	5,1	2,02	2,10	2,02	2,02
<b>DCB 1753</b>	7,6	11	7,6	10	8,2	8,4	11	10,5	2,08	1,76	2,45	2,05
<b>DCB 1754</b>	5,8	5,8	6	6	6	6,2	8	9	2,03	2,07	2,33	2,50
<b>DCB 1755</b>	6	8,5	6	14	8	8	12	13	2,33	1,94	3,00	1,93
<b>DCB 1756</b>	6	9	6	8	6,1	6,5	9	9	2,02	1,72	2,50	2,13

Elaborado por: Esteban Guzmán, 2011.

**Tabla 2. Grupos de color de las colonias aisladas.**

<b>Nº.</b>	<b>Micelio Aéreo</b>	<b>Reverso colonia</b>	<b>ID del microorganismo.</b>
<b>1</b>	Manilla	Manilla	B1,4,10,15,18,17,13,14,16,3,8,19,20,21,23,24 25,26,29,28,31,38,43,44,57,58,59,63,67,87,88, 85,94,95,108,110,117,124.
<b>2</b>	Light buff	Light buff	B2,7,11,49,46,47,48.
<b>3</b>	Primrose	Primrose	B13,76,86,102,122.
<b>4</b>	Vellum	Vellum	B5,9,39,65,93,98,116.
<b>5</b>	Blanco	Manilla	B22,37,82.
<b>6</b>	Deep cream	Deep cream	B30,39,53,64,68,81,109.
<b>7</b>	Light brown	Light Brown	B27,40.
<b>8</b>	Canary yell.	Can.yellow	B35,112.
<b>9</b>	Apricot	Light orang	B32,107.
<b>10</b>	Beige	Beige	B42,78,114.
<b>11</b>	Biscuit	Biscuit	B41,72,83,99,125.
<b>12</b>	Medium sea	Grey	B51,123.
<b>13</b>	Pale cream	Pale cream	B90,84,75,61,55.
<b>14</b>	Golden	Yellow	B30,56,73,91,96,105,123.
<b>15</b>	Lemon	Lemon	B111,79,60.
<b>16</b>	Light straw	Light Straw	B62,70,97,100,106.
<b>17</b>	Blanco	Deep chrome	B71.
<b>18</b>	Bold yellow	Dark Violet	B118,74.
<b>19</b>	Dark violet	Apricot .	B6.
<b>20</b>	Apricot	Light orang.	B32,107.
<b>21</b>	Light orang.	Pink	B33.
<b>22</b>	Salmon	Dove grey	B50,54,89,120.
<b>23</b>	Dove grey	Dove grey	B103.

Elaborado por: Esteban Guzmán, 2011.



# **ANEXO 5**

## **CARACTERIZACION MICROSCÓPICA**

Tabla 1. Caracterización microscópica.

<b>CODIGO</b>	<b>T. gran</b>	<b>Largo</b>	<b>Ancho.</b>	<b>Diametro</b>
<b>DCB</b>	<b>1631</b>	Bacilo +	1,5	0,5
<b>DCB</b>	<b>1632</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1633</b>	Bacilo +	1,5	0,5
<b>DCB</b>	<b>1634</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1638</b>	Bacilo +	1,5	0,5
<b>DCB</b>	<b>1639</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1640</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1641</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1642</b>	Bacilo +	1,5	0,5
<b>DCB</b>	<b>1643</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1644</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1645</b>	Bacilo +	0,6	0,3
<b>DCB</b>	<b>1646</b>	Cocos +		1
<b>DCB</b>	<b>1647</b>	Cocos +		0,5
<b>DCB</b>	<b>1648</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1649</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1650</b>	Cocos +		0,5
<b>DCB</b>	<b>1651</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1652</b>	Bacilo +	1,5	0,5
<b>DCB</b>	<b>1653</b>	Bacilo +	1,1	0,6
<b>DCB</b>	<b>1654</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1655</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1656</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1657</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1658</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1659</b>	Bacilo +	1,1	0,6
<b>DCB</b>	<b>1660</b>	Bacilo +	1	0,5
<b>DCB</b>	<b>1661</b>	Bacilo -	6	0,3
<b>DCB</b>	<b>1662</b>	Bacilo -	6	0,3
<b>DCB</b>	<b>1663</b>	Bacilo -	6	0,3
<b>DCB</b>	<b>1664</b>	Bacilo +	1,5	1
<b>DCB</b>	<b>1665</b>	Bacilo +	2	0,3
<b>DCB</b>	<b>1667</b>	Bacilo -	6	0,3
<b>DCB</b>	<b>1668</b>	Bacilo +	2	0,5
<b>DCB</b>	<b>1670</b>	Bacilo +	1,1	0,2
<b>DCB</b>	<b>1671</b>	Cocos +		0,5
<b>DCB</b>	<b>1673</b>	Bacilo +	1,2	0,3
<b>DCB</b>	<b>1675</b>	Bacilo +	1,5	1

Elaborado por: Esteban Guzmán, 2011.

Tabla 1. Continuación.....

<b>DCB</b>	<b>1676</b>	Bacilo +	2	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1678</b>	Cocos +			0,4
<b>DCB</b>	<b>1680</b>	Bacilo +	1,5	1	
<b>DCB</b>	<b>1681</b>	Bacilo +	1,5	1	
<b>DCB</b>	<b>1683</b>	Bacilo +	1,5	1	
<b>DCB</b>	<b>1684</b>	Cocos +			0,4
<b>DCB</b>	<b>1685</b>	Cocos +			1
<b>DCB</b>	<b>1686</b>	Cocos +			1
<b>DCB</b>	<b>1687</b>	Bacilo +	1,1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1688</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1689</b>	Bacilo +	1,1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1690</b>	Cocos +			1
<b>DCB</b>	<b>1691</b>	Cocos +			1
<b>DCB</b>	<b>1693</b>	Bacilo +	1,1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1694</b>	Bacilo +	0,5	0,1	
<b>DCB</b>	<b>1695</b>	Bacilo +	1,5	1	
<b>DCB</b>	<b>1696</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1697</b>	Bacilo +	1	0,4	
<b>DCB</b>	<b>1698</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1700</b>	Bacilo +	1,2	0,6	
<b>DCB</b>	<b>1701</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1702</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1703</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1704</b>	Bacilo +	1	0,4	
<b>DCB</b>	<b>1705</b>	Cocos +			1
<b>DCB</b>	<b>1706</b>	Bacilo +	1	0,4	
<b>DCB</b>	<b>1707</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1708</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1709</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1711</b>	Cocos +			1
<b>DCB</b>	<b>1712</b>	Cocos +			1
<b>DCB</b>	<b>1714</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1717</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1718</b>	Cocos +			0,5
<b>DCB</b>	<b>1719</b>	Bacilo +	1,5	1	
<b>DCB</b>	<b>1720</b>	Bacilo +	1,5	1	
<b>DCB</b>	<b>1721</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1722</b>	Cocos +			1
<b>DCB</b>	<b>1723</b>	Bacilo +	1	0,5	

Elaborado por: Esteban Guzmán, 2011.



Tabla 1. Continuación.....

<b>DCB</b>	<b>1724</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1725</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1726</b>	Cocos +			0,5
<b>DCB</b>	<b>1732</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1733</b>	Cocos +			1
<b>DCB</b>	<b>1735</b>	Bacilo +	2	1	
<b>DCB</b>	<b>1738</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1739</b>	Cocos +			0,5
<b>DCB</b>	<b>1740</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1741</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1742</b>	Bacilo +	2	1	
<b>DCB</b>	<b>1743</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1744</b>	Cocos +			0,5
<b>DCB</b>	<b>1745</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1746</b>	Cocos -		0,5	
<b>DCB</b>	<b>1747</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1748</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1749</b>	Bacilo +	2	1	
<b>DCB</b>	<b>1750</b>	Bacilo +	1,5	1	
<b>DCB</b>	<b>1752</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1753</b>	Bacilo +	1	0,5	
<b>DCB</b>	<b>1754</b>	Bacilo +	1,5	1	
<b>DCB</b>	<b>1755</b>	Bacilo +	2	1	
<b>DCB</b>	<b>1756</b>	Bacilo +	1	0,5	

Elaborado por: Esteban Guzmán, 2011.